

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-23676
(P2000-23676A)

(43) 公開日 平成12年1月25日 (2000.1.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/705		C 0 7 K 14/705	4 B 0 6 4
16/28		16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 21 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-199048
(22) 出願日 平成10年7月14日 (1998.7.14)

(71) 出願人 000000033
旭化成工業株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(72) 発明者 大野 剛
静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内
(72) 発明者 石丸 弘
東京都千代田区有楽町1丁目1番2号 旭化成工業株式会社内
(72) 発明者 小塩 岳弘
静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5

(57) 【要約】

【課題】 新規の7回膜貫通型受容体蛋白質、またその蛋白質をコードするcDNA、その蛋白質の発現系、さらにその蛋白質の抗体を提供する。

【解決手段】 マウス肺より、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のcDNA断片を取得した。そのcDNAコード領域全長を取得し、そのコードする新規蛋白質の発現系を作成し、さらにその抗体を作成する。

【効果】 本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5は、ガン細胞の増殖を制御する医薬品を検索することにより使用が可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5またはその塩。

【請求項2】 請求項1記載の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項3】 請求項1記載の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5をコードする塩基配列を有する核酸を含有する核酸。

【請求項4】 配列表配列番号2で表される塩基配列を有する請求項3記載の核酸。

【請求項5】 配列表配列番号2で表される塩基配列のうち少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体。

【請求項6】 配列表配列番号2で表される塩基配列に相補的な配列のうち少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体。

【請求項7】 請求項4記載の核酸を含有するベクター。

【請求項8】 請求項7記載のベクターを保持する7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5発現形質転換体。

【請求項9】 請求項8記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜に7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を生成せしめることを特徴とする7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5またはその塩の製造方法。

【請求項10】 請求項1記載の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に対するリガンドの決定方法。

【請求項11】 (i) 請求項1記載の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii) 請求項1記載の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行うことを特徴とするリガンドと請求項1記載の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項12】 請求項1記載の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規な7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5、それを構成している部分ペプチドまたはこれらの塩に関する。また、本発明は、前記

7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5、それを構成している部分ペプチドをコードする核酸あるいはその誘導体に関する。

【0002】 さらに、本発明は、この核酸を用いて遺伝子操作により7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を発現させる7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の製造方法、及びそれに使用される発現ベクター及び形質転換体に関する。また、さらに本発明は、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を用いて、この蛋白質に対するリガンドを決定する方法、この蛋白質との結合を阻害する化合物をスクリーニングする方法あるいはこの蛋白質に対する抗体に関する。本発明では、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を用いガン細胞の検出、あるいはガン細胞を含む種々の細胞の増殖や機能を制御する医薬品を開発することができる。

【0003】

【従来の技術】 ガンは体細胞の無秩序な増殖を病態とする疾患である。これまでにガンの発生・進展に関与する多数の遺伝子が単離され、多段階的にこれらの遺伝子の異常が蓄積されてくるに従ってガンが発生し、さらに増悪していくことが証明されてきた。これらのガン遺伝子の発見やヒトのガンで起きている遺伝子異常を明らかにすることは、単にガン化の機構を分子レベルで解明するにとどまらず、臨床の場においても遺伝子診断、治療へつなげる重要な知見である(蛋白質 核酸 酵素、42、1711ページ)。しかし、こういったガン化のメカニズム、増殖能の維持などについてすべてが理解されているわけではない。

【0004】 こういったガン遺伝子の中には、チロシンキナーゼであるもの(Flt-1など)、細胞内のアダプター分子(Casなど)や低分子量G蛋白質(Ras, Rhoなど)のように種々のタイプの遺伝子が知られている。そのうちの一つとして、masと呼ばれる7回膜貫通型受容体が知られている(Young D. ら、Cell, 45, 711-719 (1986))。この遺伝子は当初ヒトの類上皮腫ガンから得られ、のちにラット(Young D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5339-5342 (1988))、マウス(Metzger R. ら、FEBS Letters 357, 27-32 (1995))から対応する遺伝子が得られ、マウス・ラットでは中枢神経系にこの遺伝子が発現していることが知られている(Young D. ら、前掲、Metzger R. ら、前掲、Martin K. A. ら、Developmental Brain Res. 68, 75-82 (1992))。さらに、これらに類似した遺伝子として、mrg (Monnot C. ら、Mol. Endocrinol. 5, 1477-1487 (1991))が報告されている。これらの遺伝子は、ある種の細胞では生理的条件より高い濃度のアンジオテ

ンシンの反応を伝達するらしい (Andrawisら、Am. J. Med. Sci. 302, 329-334 (1991), Monnot C. ら、前掲)。

【0005】一方で、アンジオテンシンなどの7回膜貫通型受容体のリガンドとして知られているものが細胞の増殖に関連しているという報告も数多くあり (例えば、Bunkenburg B. ら、Hypertension 20(6):746-754 (1992)、Freeman E.J. ら、Hypertension 28(1):104-108 (1996)、など)、7回膜貫通型受容体が増殖に関連していることが示されている。

【0006】従って、これらの受容体の機能を変化させるもの、すなわちその受容体と結合して刺激するもの、受容体と結合して刺激を遮るもの、その刺激が細胞内に伝達されることを阻害するものを得ることができれば、ガン細胞などの機能を増殖を正や負に制御し、さらには、7回膜貫通型受容体の機能の不足や過剰に起因する疾患の治療に役立つ物質を得られることが予想される。

【0007】7回膜貫通型受容体においては、多くの場合、受容体とシグナル分子の関係は1対1対応に対応しているのではない。従って、疾患の治療を考えた場合にはシグナル分子を知ることだけでは不十分である。例えば、セロトニンの場合には、セロトニンという単一のシグナル分子に対し、イオンチャンネル型受容体という全く異なるシグナル伝達経路の受容体を含む14種の受容体が知られており、さらに、個々の受容体に特異的に結合する化合物も知られており (1996 Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement, Trends Pharmacol. Sci., 1996年)、それぞれ異なる疾患の治療への応用も考えられている。また、例えばケモカイン群の場合には、単一のシグナル分子が多数の受容体と反応すると同時に、単一の受容体が多数のシグナル分子と反応する例も多く知られている (C. A. Powerら、Trends Pharmacol. Sci. 17, 209-213, 1996年)。

【0008】従って、仮に単一のシグナル分子がガンなどの疾患の原因であるとしても、細胞の種類によって異なる受容体がある場合には複数存在し、疾患の原因である特定の細胞群の機能を特異的に制御する場合には、その細胞に作用するシグナル分子の特定よりもその細胞に発現している受容体を特定することが重要となる。例えば、白血球に作用するシグナル分子群ケモカイン群の場合、シグナル分子RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell expressed and secreted) に対しては種々の白血球が反応するが、好酸球にはケモカイン受容体の一つCCR3が特異的に発現してお

り、好酸球を特異的に制御する方法を検索する際には受容体CCR3が必要となる (Howard, O. M. Z. ら、TIBTECH, 14, 46-51, 1996年)。

【0009】さらに、これらの受容体の中にはウイルスの感染の際の受容体として働くものがあることが知られており (たとえば、Choe H. ら、Cell 85, 1135-1148, 1996年)、これらの受容体に結合する分子がウイルスの感染を防ぐことも知られている (たとえば、Bleul C. C. ら、Nature, 382, 829-833, 1996年)。こういった場合にも、ウイルスの感染する細胞に発現する受容体を知ることが肝要となる。

【0010】7回膜貫通型受容体蛋白質に作用する内因性の物質は様々な受容体に対し様々な物質が知られている。例えば、生理アミンであるグルタミン酸、ドーパミンはそれぞれグルタミン酸受容体群、ドーパミン受容体群に結合する。また、ペプチドである神経ペプチドY、エンドセリンはそれぞれ神経ペプチドY受容体群、エンドセリン受容体群に結合する (Watson, S. およびSteve Arkinstall著、The G-protein linked receptor FactsBook, Academic Press Inc., 1994年)。これらの中には、アンジオテンシンなどのように増殖に作用することが知られているものとそうでないものがある。

【0011】これらの7回膜貫通型受容体蛋白質を活性化する物質は、天然・非天然を問わず、その物質と7回膜貫通型受容体蛋白質、受容体を発現している細胞の3者に依存して様々な細胞内シグナル分子の変動を引き起こす。そのシグナル分子の変動は、例えば、細胞内cAMP濃度の上昇・下降、イノシトールリン酸濃度の上昇、細胞内カルシウム濃度の上昇、といった反応があり (Watson, S. およびSteve Arkinstall著、The G-protein linked receptor FactsBook, Academic Press Inc., 1994年)、そのそれぞれを測定する方法も開発されている。従って、これらの反応を測定することにより、特定の物質が特定の7回膜貫通型受容体蛋白質を活性化するかどうかあるいはその活性化を妨げるかどうかを判断する事ができる。このような物質が7回膜貫通型受容体蛋白質と結合して生じる、増殖・遺伝子発現の変動・化学遊走などの生理学的な現象を観察する方法も知られており、同じく、特定の物質が特定の7回膜貫通型受容体蛋白質を活性化するかどうかあるいはその活性化を妨げるかどうかを判断することができる。

【0012】このように7回膜貫通型受容体蛋白質に作用する物質の同定方法としては種々の方法が知られており、これらの方法を利用するためには、新規の7回膜貫

通型受容体蛋白質を同定することが肝要である。こういった考察に基づくと、ガン細胞を含む種々の細胞の増殖や機能を制御し、疾患の制御を行うためには、これまで知られていない7回膜貫通型受容体を取得することが大きな課題である。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、ガン細胞を含む種々の細胞の増殖や機能を制御し、疾患をコントロールする手法はいまだ完成されていない。その最大の原因は、増殖を制御している受容体蛋白質、特に7回膜貫通型受容体蛋白質が同定されていない点にある。本発明の課題は、新規な7回膜貫通型受容体蛋白質、またその蛋白質をコードするcDNA、その蛋白質の発現系、この蛋白質の応用、さらにその蛋白質の抗体を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、白血球に新規7回膜貫通型受容体が存在することを予想し、これらが白血球の機能や増殖を制御する医薬品の探索に役立つと考えた。そこで実際に白血球に発現している新規な7回膜貫通型受容体蛋白質cDNAを取得するために、Differential Display法(例えば、Liang, P. ら、Curr. Biol. 7, 274-280, 1995年)、RDA法(Lisitsyn, N. ら、Science 259, 946-951, 1993年)、degenerative PCR法(Innis M. A. ら、PCR Protocols, pp39-53, 1990年)など種々の方法を、種々のヒト組織、白血球、白血病細胞株などを材料に検討した。特にdegenerative PCR法については、実施例3に示すプライマーを一例とする20種以上のプライマーを試験した。このような鋭意努力の結果、マウス由来EAE(実験的アレルギー性脳脊髄炎)発症性自己反応性T細胞4R312より、発明者らがERGファミリーと名付けた遺伝子ファミリーのcDNA断片を複数取得した。そのうち、そのcDNA断片をプローブとしてマウス肺cDNAライブラリーより本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のcDNAコード領域全長を取得した。そして、その配列を他の遺伝子と比較することにより、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5が細胞の増殖に関連していることを見出した。また、公知の遺伝子データベースのサーチにより、ERGファミリーの遺伝子がヒトにも存在することを示した。そして、そのcDNAがコードする新規タンパク質の発現系を作成し、さらにその抗体を作成することにより、本発明を完成した。

【0015】すなわち、本発明は配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列を含有する7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に関する。また、配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする核酸、

これら核酸群の中から選ばれる核酸と、宿主細胞中で発現可能なベクター核酸とを連結してなる組み換えDNA体ベクター、これら組み換えDNA体ベクターにより形質転換された7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5発現細胞、これらの細胞を培養し培養細胞の細胞膜表面に配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列を含有するポリペプチド(7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5)を生成させることを特徴とする7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の製造方法に関する。また、本発明は、この7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に対するリガンドのスクリーニング方法、およびERG5とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法に関する。

【0016】さらに、本発明は、この7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を特異的に認識する抗体に関する。本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のアミノ酸配列を配列表配列番号1に示し、それをコードするDNA配列を配列表配列番号2に示した。これらの配列をデータベース(GenBankリリース103.0, October, 1997年)で比較したところ、これらは新規な配列であった。また、特許配列データベースDGENE(Derwent Information Ltd., MAY 31, 1998)で比較したところ、これらは新規な配列であった。

【0017】また、該7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の部分ペプチドを免疫原としてそれに対する抗体(抗体を含有する抗血清も含む)を作製し、この7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の精製法を確立し、本発明を完成した。以下、本発明を詳細に説明する。配列表において、配列番号1のアミノ酸配列は、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のアミノ酸配列である。

【0018】また、配列表番号2の配列は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の全アミノ酸配列及びそれをコードしているcDNA配列である。配列表配列番号3はEAEを発症させる際に用いたペプチドの配列である。配列表配列番号4および5は、メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の7回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインしたdegenerative PCR法のためのプライマーの配列である。

【0019】配列表配列番号6および7、8はEAE発症性T細胞4R312より取得されたERGファミリーのクローン3種のcDNA配列である。配列表配列番号9および10は、ERG5の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマーの配列である。なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれアミノ基末端(以下、N末という)及びカルボキシル基末端(以下、C末という)であり、また塩基配列の左端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

【0020】また、表に関しては、表1は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5と既知の遺伝子とをアミ

ノ酸配列での相同性を比較したものである。Genetyx-Mac/DB Ver. 38.0 (Software Development Co., Ltd.) を用いてGenBank CDS (リリース103.0, October, 1997年) をサーチしたのち、上位10種についてGenetyx-Mac Ver. 9.0 (Software Development Co., Ltd.) を用いてアミノ酸の同一度を計算させた結果である。表2は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5と既知の遺伝子とをcDNA配列での相同性を比較したものである。Genetyx-Mac/DB Ver. 38.0を用いてGenBank (リリース103.0, October, 1997年) をサーチしたのち、上位20種についてGenetyx-Mac Ver. 9.0を用いてcDNA配列の同一度を計算した結果である。

【0021】また、本発明で述べられる遺伝子操作に必要なcDNAの作製、ノーザンブロットによる発現の検討、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング、組換えDNAの作製、DNAの塩基配列の決定、cDNAライブラリーの作製等の一連の分子生物学的な実験は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、たとえば、Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989年、Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Pressを挙げることができる。

【0022】本発明のポリペプチドは、少なくとも配列表配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドを有するが、自然界で生じることが知られている生物種内変異、アレル変異等の突然変異及び人為的に作製可能な点変異による変異によって生じる改変体も、配列表配列番号1のポリペプチドの性質を失わない限り配列表配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものとして本発明の新規化合物に含まれる。そのアミノ酸の改変、置換に関しては例えばBennettらの特許出願 (WO 96/2645) などに詳しく記載されており、これらを参考にして作製することができ、これらの方法によって改変、置換されたポリペプチドも本発明に含まれる。

【0023】配列表配列番号1のアミノ酸配列から予想されることとして、糖鎖が付加される部分がある。N-グリコシド結合の共通配列は、Asn-X-Ser/Thrであることが知られているが、配列番号1で2番目のAsn (Asn-Ser-Thr)、94番目のAsn (Asn-Ile-Ser) がそれと同等な配列を有しN-グリコシド修飾を受けている可能性がある。また、N-アセチル-D-ガラクトサミンのO-グリコシ

ド結合を推定する部分として、セリンまたはスレオニン残基が頻出する部分が考えられる。これらの糖鎖が付加されたタンパク質の方がポリペプチドそのものよりも一般に生体内での分解に対して安定であり、また強い生理活性を有していると考えられる。したがって、配列番号1の配列を含有するポリペプチドのアミノ酸配列の中にN-アセチル-D-グルコサミンやN-アセチル-D-ガラクトサミンなどの糖鎖がN-グリコシドあるいはO-グリコシド結合してなるポリペプチドも本発明に含まれる。

【0024】また、実施例4に示すように、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の天然のcDNA断片はマウス肺より取得された。従って、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のmRNAはマウス肺に発現していることが示された。mRNAは、細胞内のメカニズムにより蛋白質へと翻訳されるので、マウス肺における本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の天然のmRNAの検出は7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の発現と同等と考えられる。

【0025】これら配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有する7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5またはその塩、または、その蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、診断を目的とした抗体の作成や、治療を目的とした医薬品の検索に有用である配列番号1のアミノ酸配列をデータベース (GenBank CDS (リリース103.0, October, 1997年) で比較したところ、これらは新規な配列であった。該アミノ酸配列をKyte-Doolittleの方法 (J. Mol. Biol. 157:105, 1982) に従って、アミノ酸配列から疎水性部分、親水性部分を解析した。その結果、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5は細胞膜通過部分を7つ有する細胞膜蛋白質として、細胞表面に発現されることが明らかとなった。

【0026】表1に本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5と上記データベースとの比較で類似度が高いとされた、これまで知られている7回膜貫通型受容体蛋白質の配列の相同性の比較を示した。本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5は、既知のヒトおよびその他のほ乳類の7回膜貫通型受容体蛋白質と約40%以下の相同性を示し、新規なヒト7回膜貫通型受容体蛋白質であることが示された (表1)。既知の受容体の種間の相同性は、例えば、アンジオテンシン受容体Iaの場合、ヒト (Swiss-Prot Entry AG2R-Human) とラット (Swiss-Prot Entry AC22-Rat) 間で90%を越える。従って、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5は、これまでマウス以外の種で知られている受容体蛋白質のマウスにおける対応物ではないと考えられる。しかし、ほかの7回膜貫通型受容体蛋白質との相同性がせいぜい40%であり、本発明のペプチドERG5が7回膜貫通型受容

体に属する蛋白質であることがこのことから示された。これらの相同性から期待される既知のリガンドとしては、例えば、アナフィラトキシン、ケモカイン群やソマトスタチン、アンジオテンシン、ブラディキニンなど

の小ペプチドのホルモンなどが挙げられる。

【0027】

【表1】

ERG5蛋白質のアミノ酸配列と既知の受容体のアミノ酸配列の比較

順位	エントリー名	コメント	一致度 (%)
1	RATMAS	Rat mas	38.0
2	HUMMAS	Human mas	37.0
3	MMWASPA	Mouse mas	36.0
4	RATRTA	Rat G protein coupled receptor RTA	34.9
5	S78653	Human mas-related gene Genome	37.2
6	MMU79525	Mouse orphan G protein coupled receptor Dez	30.3
7	HSU79526	Human G protein coupled receptor Dez isoform a	29.7
8	HSU79527	Human G protein coupled receptor Dez isoform b	29.7
9	HSU28488	Human putative G protein coupled receptor AZ3B	27.1
10	HSC3AAREC	Human C3a anaphylatoxin receptor	27.1

【0028】また、配列表配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質の天然のcDNA配列については、配列表配列番号2にアミノ酸配列とともに示した。これらの遺伝子配列に関し、アミノ酸レベルの変異がなくとも、自然界から分離した、染色体DNA、またはcDNAにおいて、遺伝コードの縮重により、そのDNAがコードするアミノ酸配列を変化させることなくDNAの塩基配列が変異した例はしばしば認められる。また、5' 非翻訳領域及び3' 非翻訳領域はポリペプチドのアミノ酸配列の規定には関与しないので、それらの領域のDNA配列は変異しやすい。このような変異や遺伝コードの縮重によって得られる塩基配列も本発明のDNAに含まれる。以下、これらDNA群を本発明のDNAとよぶ。

【0029】配列表配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同等なポリペプチドをコードする本発明のDNAは、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を製造する上で有用である。配列表配列番号2のDNA配列をデータベース (GenBankリリース103, 0, October, 1997年) で比較したところ、これは新規な配列であった。表2に配列番号2の7回膜

貫通型受容体蛋白質ERG5のcDNA配列とこれまで知られている7回膜貫通型受容体蛋白質のcDNAの配列の相同性の比較を示した。本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のcDNAは、既知のヒトおよびその他の哺乳類の受容体と51%以下の相同性を示し、新規なマウスの7回膜貫通型受容体蛋白質cDNAであることが示された。既知の受容体cDNAの種間の相同性は、例えば、アンジオテンシン受容体の場合、ヒト (GenBank Entry HSU20860) とラット (GenBank Entry S67465) 間で84%程度である。従って、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5はcDNA配列からみてもこれまでマウス以外の種で知られている受容体蛋白質のマウスにおける対応物ではないと考えられる。また、他の遺伝子との相同性が51%以下であるので、他の既知の遺伝子を用いて一般的に行われているクロスハイブリダイゼーションを用いたスクリーニングでクローニングすることは困難であると考えられる。

【0030】

【表2】

ERG5蛋白質のcDNA配列と既知の受容体のcDNA配列の比較

順位	エントリー名	コメント	一致度 (%)
1	MMU79525	Mouse orphan G protein coupled receptor Dez	50.1
2	HUMCR	Human fMLP receptor	48.7
3	HSU79526	Human G protein coupled receptor Dez isoform a	49.4
4	HSU79527	Human G protein coupled receptor Dez isoform b	49.4
5	RATMAS	Rat mas	55.7
6	RATRTA	Rat G-protein coupled receptor RTA	54.2
7	S78653	Human mas-related gene Genome	51.8
8	RNCPRCOCR	R. norvegicus putative G protein coupled receptor	48.3
9	MMMASPA	Mouse mas	55.5
10	CFCOMC5AM	C. familiaris complement C5a receptor	49.7
11	BTU19947	B. taurus IL-8 receptor	49.0
12	CHKEATP	Chicken erythrocyte anion transport protein	48.1
13	CHKATE	Chicken erythrocyte anion transporter	47.9
14	SSU72758	S. scrofa orphanin FQ/nociceptin receptor	48.7
15	HUMMAS	Human mas	53.8
16	RATGENOME	Rat alpha-2B-adrenergic receptor promotor region	48.1
17	RATADRA1B	Rat alpha-2B-adrenergic receptor	45.2
18	RATAADRE01	Rat alpha-2B-adrenergic receptor exon1	45.1
19	HSU75381	Human apoptosis mediating receptor	48.9
20	MUSSSTR3A	Mouse somatostatin receptor	47.5

【0031】実際に、クロスハイブリダイゼーションのアプローチを用いた例も数多くあるが、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5はクローニングされていない(例えば、Monnot C.ら、Mol. Endocrinol. 5, 1477-1487(1991))。配列番号2で示される塩基配列を有するDNAは、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を作成する上で、また、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の詳細な機能を検討する上で有用である。

【0032】さらに、配列表配列番号2の遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体、および/または、配列表配列番号2の遺伝子配列に相補的な遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体、を用いれば、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のcDNAクローン、cDNA、ゲノムDNA、ゲノム遺伝子クローンなどを検出することができる。必要な核酸の長さはその配列の特異性、検出しようとしている核酸との結合の安定性によって異なるが、DNAを用いてPCRによって検出する場合には、Tm(2本鎖解離温度)が45℃以上であることが望ましい。PCRのようにDNA同志が結合する場合には、一つのGC結合を4℃とし、一つのAT結合を2℃として合算し、Tmを推定することができる。従って、GCコンテンツが高い場合には12merの、一般的な50%ぐらいのG

Cコンテンツ領域で16merの核酸が必要となる。

【0033】アーティファクトの可能性を減らすためには20mer以上であることが望ましい。よりDNAとの結合が安定な核酸誘導体を用いる場合にはさらに短い核酸を用いて検出することが可能である。例えば、遺伝子診断を目的としてこれらの遺伝子を調べる方法として、配列表配列番号2およびその相補鎖の一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、つまりDNA、RNA、及びそれらがメチル化、メチルフォスフェート化、脱アミノ化、またはチオフォスフェート化された誘導体を用い、ハイブリダイゼーション、PCR等の手法によって行うことがあげられる。同様な方法でヒト、ラット等の他の生物の本発明の遺伝子のホモログの検出や遺伝子クローニングができる。さらに、ヒト、マウスを含めたゲノム上の遺伝子のクローニングも同様に可能である。従って、そのようにしてクローニングされたこれら遺伝子を用いれば、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の更に詳細な機能も明らかにすることが出来る。例えば、近年の遺伝子操作技術を用いれば、トランスジェニックマウス、ジーンターゲティングマウス、また、本発明の遺伝子と関連する遺伝子を共に不活化したダブルノックアウトマウスなどのあらゆる方法を用いることが出来る。また、本発明の遺伝子のゲノム上の異常があれば、遺伝子診断、遺伝子治療への応用も可能である。

【0034】また、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質

ERG5の更に詳細な機能を明らかにすることを目的として、細胞や生体へのアンチセンス核酸の投与も考えられる利用法である。本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の過剰な反応（例えばガンなどの細胞の異常増殖）が病態となっている疾患については、これらアンチセンス核酸により遺伝子の発現を抑えることによって、治療を行うことも可能である。また、アンチセンス核酸を適当なベクターに組み込み、そのベクターを用いることも可能である。これらアンチセンス核酸の作成例・使用例についてはMurray, J. A. H. 編、ANTISENSE RNA AND DNA, Wiley-Liss, Inc., 1992年、に詳しい。

【0035】以上のように、配列表配列番号2の遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体、及び配列表配列番号2の遺伝子配列の相補的な配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体は診断、治療などに有用である。

【0036】本発明の核酸を含有するベクターとしては、例えば大腸菌由来のpBR322, pUC8, pUC19, pUC18, pUC119（いずれも日本国宝酒造社製）などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で複製増殖できるものであればいずれも用いることができる。実施例5にベクターとしてpTargetを、宿主として大腸菌を用いた例を示した。また本発明のDNAを含有するファージベクターとしては、例えばλgt10, λgt11（米国Stratagene社製）などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で増殖できるものであれば用いることができる。このようにして、得られたベクターは適当な宿主、例えばエシェリヒア（*Escherichia*）属菌、バチルス（*Bacillus*）属菌、などにカルシウムクロライド法を用いて導入し、本発明のDNAを含有するベクターを保持する形質転換体を作成することができる。上記エシェリヒア属菌の例としては、エシェリヒア コリ K12 HB101, MC1061, LE392, JM109, INVαF' などが挙げられる。上記バチルス属菌の例としてはバチルス サチリスM1114等が挙げられる。また、ファージベクターは、例えば増殖させた大腸菌にインビトロパッケージング法（Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 2442-1978）を用いて導入することができる。

【0037】尚、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドpERG5を大腸菌INVαF' に遺伝子導入した形質転換細胞（実施例5）E. coli: INVαF' -pERG5は、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年3月19日に受託番

号: FERM BP-6302として寄託されている。

【0038】本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5をコードする塩基配列を有する核酸を含有するベクターは、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5をコードする塩基配列を有する核酸を製造する上で、また、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の核酸を保持する形質転換体を作成する上で有用である。上記の方法にて作成した本発明の核酸を用いた7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の発現には、成書によって知られている（Kriegler, GeneTransfer and Expression-A Laboratory Manual, Stockton Press, 1990; および横田ら、バイオマニュアルシリーズ4, 遺伝子導入と発現・解析法、羊土社、1994）、多数の方法が用いられる。すなわち、分離した7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のアミノ酸配列をコードするcDNAを適当な発現ベクターにつなぎ、動物細胞、昆虫細胞などの真核細胞、バクテリアなどの原核細胞を宿主として生産させることができる。

【0039】本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を発現させる際に、本発明のポリペプチドをコードする核酸はその5' 末端に翻訳開始コドン（ATG）を有し、また、3' 末端には翻訳終了コドン（TAA）を有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終了コドンは適当な合成核酸アダプターを用いて付加することもできる。更に該DNAを発現させるには上流にプロモーターを接続する。ベクターとしては上記の大腸菌由来プラスミド、枯草菌由来プラスミド、酵母由来プラスミド、あるいは入ファージなどのバクテリオファージおよびレトロウィルス、ワクシニアウィルスなどの動物ウィルスなどが挙げられる。

【0040】本発明に用いられるプロモーターとしては、遺伝子発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、tacプロモーター、trpプロモーター、lacプロモーターなどが好ましく、宿主がバチルス属菌である場合にはSPO1プロモーター、SPO2プロモーターなどが好ましく、宿主が酵母である場合にはPGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が原核細胞である場合には、プロモーターとともにリボゾーム結合部位をもつことが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーター、メタルチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが利用できる。

【0041】本発明のポリペプチドを発現させる時、配列表配列番号1のアミノ酸配列と実質的に同等な蛋白質をコードする核酸のみでもよいが、膜表面への発現を保証する必要がある場合には、既知シグナルペプチドをコードする核酸をN末に付加したり、産生されたポリペプ

チドの検出を容易にするための既知抗原エピトープをコードする核酸を付加することで、特別の機能を付加した蛋白質を生産させることもできる。このような技術の一つの例として、Choe, H. ら、Cell, 85, 1135-1148, 1996年を挙げることができる。

【0042】本発明者らは、実施例5に示したごとく、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を発現する発現ベクターとして配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするDNAを発現ベクターpTarget (Promega社)につなぎ、本発明のDNAを含む発現ベクターを作製した。このようにして構築された7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5をコードするDNAを含有する発現ベクターを用いて、本発明のDNAを含むベクターを保持する形質転換体を製造する。

【0043】宿主としては例えばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。動物細胞としては、例えばサル細胞であるCOS-7, Ver o細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO, カイコ細胞SF9などが挙げられる。このようにして得られる本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5をコードする塩基配列を有する核酸を含有するベクターは、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を産生する上で有用である。

【0044】実施例6に示したごとく、上記の発現ベクターを遺伝子導入し、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5をCHO細胞、293細胞などで発現させることにより、これら発現プラスミドで形質転換された形質転換体が得られる。これらの形質転換体は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を産生する上で有用である。本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5と実質的に同等な蛋白質をコードする塩基配列を有する核酸を含有するベクターを保持した形質転換体を作成し、それぞれ公知の方法により、適当な培地中で適当な培養条件により培養することによって、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5またはその塩を製造することができる。例えば実施例6のようにWestern blottingを用いたり、また、FACSによって検査することにより、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の生産を確認することができる。

【0045】このようにして作成した、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5またはその塩を用いて、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5のリガンドを決定することができる。そのためには、まず、リガンド候補である試験化合物を、純化した、または、未精製の、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5と接触させ、試験化合物の本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に対する結合もしくはその結合により引き起こされる反応を測定する。試験化合物の本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に対する結合を測定する場合

には、純化した、または、未精製の本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5と試験化合物を接触させ、複合体量および/または未結合の試験化合物量を測定する。複合体量および/または未結合の試験化合物量を測定する方法としては、例えば、放射性化合物や色素などを用いて試験化合物を標識し、複合体と未結合の試験化合物を分離し、標識を用いて複合体量および/または未結合の試験化合物量を測定する。この一つの例を実施例7に示した。

【0046】受容体と結合する化合物が知られている場合には、その化合物を標識し、試験化合物が標識化合物と競合するかどうかをもって、試験化合物の結合を測定することもできる。これらの方法の例として、浅沼幹人ら、実験医学11, 22-29, 1993年に挙げられている方法がある。そのほかにも、SPA (Scintillation Proximity Assay) のように複合体と未結合の試験化合物を分離せずに測定する方法もある。

【0047】一方、試験化合物と本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の結合により引き起こされる反応を測定する場合には、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の共役しているシグナル伝達系によって様々な方法が考えられる。このような方法として、例えば唐木英明ら編、実験医学7, pp26-109, 1989年のように細胞内カルシウムを測定する方法、Samson, M. ら、Biochem. 35, pp3362-3367, 1996年のようにマイクロフィジオメーターを用いる方法、細胞内cAMPの量を測定する方法、などがある。リガンドとの結合によって引き起こされる反応を測定する1つの例を実施例8に示した。これらERG5蛋白質もしくはその塩、または、その部分ペプチドまたはその塩と試験化合物を接触させるERG5蛋白質に対するリガンドを決定する方法は7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に結合して細胞の反応を制御する、疾患の治療を行う物質を検索する上で有用である。

【0048】さらに上記のようにして、リガンド、すなわち、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に作用するものを発見した場合には、その作用の変化、すなわち、その活性化を行ったり、活性化を阻害したりする物質を検索することが可能である。そのことは、(i) 7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii) 7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行うことによって行うことができる。その一つの例を実施例9に示した。この方法は、7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5に作用して細胞の反応を制御する、疾患の治療を行う物質を検索する上で有用である。

【0049】7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を特異

的に認識する抗体は実施例10に示したようにして作製することができる。抗体を作製するためのペプチドの長さは特に限定されないが、ERG5蛋白質を特徴づけられる長さがあればよく、好ましくは6アミノ酸以上、特に好ましくは8アミノ酸以上のペプチドを用いればよい。このペプチドをそのまま、またはKLH (keyhole-limpet hemocyanin) やBSA (bovine serum albumin) といったキャリア蛋白質と架橋した後に必要に応じてアジュバントと共に動物へ接種せしめ、その血清を回収することでERG5蛋白質を認識する抗体(ポリクローナル抗体)を含む抗血清を得ることができる。また、抗血清より抗体を精製して使用することも可能である。接種する動物としては、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等であり、特にポリクローナル抗体作製にはヒツジ、ウサギが好ましい。また、ハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法によりモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、この場合にはマウスが好ましい。また、配列番号1に示したアミノ酸の全長または6残基以上、望ましくは8残基以上のアミノ酸配列をGST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) などと融合させたものを精製して、または未精製のまま、抗原として用いることもできる。成書 (Antibodies a laboratory manual, E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory) に示された各種の方法ならびに遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて、細胞に発現させた遺伝子組換え体抗体によっても作製することができる。このように作製された抗体は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の精製に利用できる。

【0050】また、実施例10に示したこれらの7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を特異的に認識する抗体を用いれば、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の検出、測定が可能であり、細胞の分化異常を伴う疾患、例えば悪性腫瘍、ウィルス感染などの疾患の診断薬として使用でき得る。また、実施例6に示すように、この検出、測定には、Western Blotting, FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) などを用いることができる。FACSを用いた臨床診断の例は、例えば、天神美夫ら編、フローサイトメトリーハンドブック、サイエンスフォーラム社、1984年、の第4部フローサイトメトリーの臨床医学への応用、に示されている。これら検出、測定については、Western Blotting (Immunoblotting) に関してはAntibodies a laboratory manual, E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, pp471-510にその方法の

詳細が、免疫沈降、免疫測定などに関しては、同書pp421-470, pp553-612にそれぞれ詳細が記されている。FACSの際の細胞の染色については、高津聖志、瀧伸介、免疫研究の基礎技術、羊土社、1995年、pp16-61に、FACSの操作については、天神美夫ら編、フローサイトメトリーハンドブック、サイエンスフォーラム社、1984年に詳細が示されている。

【0051】以上のように、配列表配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を発現している細胞を同定する上で有用である。

【0052】

【発明の実施の形態】以下に発明を実施する形態について例を示すが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0053】

【実施例1】4R312株の樹立

MBPペプチド(配列表配列番号3: FKNIVTPRTPPPS)はApplied Biosystems社製430A型ペプチド合成機を用いた固相法にて合成した。このMBPペプチドの濃度が8mg/mlになるように以下のMBPペプチドエマルジョン溶液を作製した。まず、完全フロイントアジュバンド(Difco社)に結核死菌(青山B株、日本ビーシージー、国立予防衛生研究所から入手)を最終濃度4mg/mlになるように加え、アジュバンド溶液とした。さらに、MBPペプチド溶液900 μ lとこのアジュバンド溶液900 μ lをガラス注射筒でよく混合し、MBPペプチドエマルジョン溶液とした。

【0054】このMBPペプチドエマルジョン溶液を、SJL/Jマウス(9週齢、メス; 日本チャールスリバーより入手)の両後肢趾の皮下に25 μ lずつ注入した。さらに1 μ gのislet activating protein (科研製薬)溶液を、免疫直後および2日後に尾静脈より200 μ lの生理食塩水溶液として注入した。肉眼での観察により臨床症状的にEAEを発症しているマウスを選び出し、免疫後63日目に、腋窩、鼠径及び膝窩リンパ節を採取した。リンパ節をメスで細かく切ったのち、シリコン栓を用いて、150番のメッシュでこし、単細胞懸濁液とした。この単細胞懸濁液を10 μ g/mlのMBPペプチドを含む培地(5% FCS (ウシ胎児血清; Bioserum社より入手)、Click's EHAA培地; Irvine Scientific Cat. No. 9582)で4 $\times 10^6$ 個/mlに調製し、25cm²のフラスコ(Corning社)に10ml/フラスコで加え、フラスコを立てて培養を開始した。

【0055】継代用の培地に含まれるFactorは以下のように調製した。RGF (Rat Growth Factor) は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のコンカナバリンA (Sigma社) および1%FCSを含むRPMI 1640培地 (GIBCO BRL社) で 10^6 細胞/ ml のSDラット (チャールスリバー) の脾細胞を48時間刺激後、上清を回収し、終濃度が $20\text{mg}/\text{ml}$ になるように α -methyl-D-mannosideを添加し、RGFとした。また、EL4supは、 $1\text{ng}/\text{ml}$ のホルボールミリステートアセテート (Sigma社) を含むD-MEM (GIBCO-BRL社; 5%FCSを含む) で 10^6 個/ ml に調製したマウスEL4.1L-2細胞 (ATCCより入手可能。ATCC TIB-181) を24時間刺激後、培養上清を回収し、EL4supとした。

【0056】前記のリンパ節細胞を、培養6日目に継代培地 (Click's EHAA培地、5%FCS、15%RGF、EL4sup 1%を含む) に培地を交換後、同じ培地で 4×10^6 個/ ml に調製し、24穴プレートに1.2ml/穴で分注し、5%二酸化炭素雰囲気中 37°C で培養した。さらに約1週間後、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のMBPペプチドおよび約 2×10^6 個/ ml の抗原提示細胞 (SJL/Jマウスの脾細胞を3000RでX線照射して調製した) の存在下で5%二酸化炭素雰囲気中 37°C で培養し (抗原刺激)、約1週間後に継代培地に培地を交換し、さらに5%二酸化炭素雰囲気中 37°C で約1週間培養した。これを培養の1サイクルとし、2週間ごとにこの培養サイクルを繰り返した。まきこみ細胞数は徐々に減らし、最終的には $2.5 \sim 5 \times 10^5$ 個/ ml で行った。この培養を3サイクル繰り返した後、限外希釈により個々のクローンに分割した。そのうちの1クローンを4R312株と命名した。4R312株も上記と同様に培養サイクルを繰り返して拡大培養し、以降の実験に用いた。

【0057】

【実施例2】4R312株のEAE発症性の確認

4R312株を実施例1に示したように拡大培養し、 5×10^6 個の抗原刺激後3日目の4R312株をSJL/Jマウス (8週齢、メス; チャールスリバーより購入) に尾静脈より注入した。2匹のマウスに注入した。

肉眼による症状観察により、一匹は5日目に一匹は6日目にEAEの発症が観察された。

【0058】

【実施例3】マウス由来の新規7回膜貫通型受容体蛋白質ET331、ET330、ET64断片の取得
マウス4R312株は実施例1に示したように拡大培養し、全体で約 1×10^7 個の細胞を培養して材料として使用した。ビベッティングにより、細胞を懸濁後、 1000rpm で15分の遠心 (KS-8300型、久保田製作所、RS3000/6型ローター) 後、上清を吸引

・廃棄し、PBS (Phosphate Buffered Salts; 大日本製薬 (株) 製 Cat. No. 28-103-05) を30ml加え懸濁後、再度同じ条件で遠心した。以下、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech製) を使い、製造者のプロトコル (Rev. 4. XV-025-00-07) 11~14頁に従って (second column purificationは行わなかった)、mRNAを抽出した。エタノール沈殿後、Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press のE5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNAに従って定量した。約 $2\mu\text{g}$ のmRNAを用い、SuperScript Choice System for cDNA Synthesis (Life Technologies製) 添付の5xFirst strand buffer $10\mu\text{l}$ 、0.1mM DTT $5\mu\text{l}$ 、RNasin (Promega社製) $5\mu\text{l}$ 、RNase free DNase (Boehringer社製) $1\mu\text{l}$ を加え、滅菌水で全量を $50\mu\text{l}$ にし、室温で5分間放置した。その後、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿後、次のようにcDNA合成を行った。SuperScript Choice System for cDNA Synthesis (Life Technologies製) を用いてcDNA合成を行った。プロトコル11~17頁 (Protocol 1および2) に従い、oligo (dT) プライマーを用いて2重鎖 (ds) DNAを合成した。その後、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿後、 $40\mu\text{l}$ の滅菌水に溶解した (これをcDNAサンプルと呼ぶ)。

【0059】このcDNAサンプルのうち $4\mu\text{l}$ を用いてPCR (polymerase chain reaction) を行った。PCRはTaqポリメラーゼ (宝酒造社製、コードR001A) を用いた。酵素に添付のバッファーを $5\mu\text{l}$ 、酵素に添付のdNTP mixture $4\mu\text{l}$ と配列表の配列番号4に示した合成オリゴヌクレオチドおよび、配列表の配列番号5に示した合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ 200pmol を加え、最終容量 $50\mu\text{l}$ とした。

【0060】この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、 95°C 1分、 40°C 2分、 72°C 3分を5サイクル行ったのち、 95°C 1分、 50°C 2分、 72°C 3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロース

・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約700bpのcDNAが増幅されていることを確認した。このバンドをゲルから切り出して Suprec01（宝酒造社製）で精製後、TA cloningキット（Invitrogen社製）を用いてクローニングした。

【0061】すなわち、ベクターとしてpCRII Vector（Invitrogen社製、以下pCRIIという）を用い、ベクターと先のDNAとをそのモル比が1:3となるように混ぜ合わせて、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）にてベクターにDNAを組み込んだ。DNAが組み込まれたベクターpCRIIを大腸菌One Shot Competent Cells INVαF'（Invitrogen社製）に遺伝子導入し、アンピシリン（Sigma社製）を50μg/ml含むL-Broth（宝酒造社製）半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth液体培地2mlに植え付け、8時間程度37℃で震とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ（Promega社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素EcoRIにて消化して、約700bpのDNAが切り出されてくることで該PCR産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているcDNAの塩基配列決定を行った。

【0062】挿入cDNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンササンプルの調製はPRISM Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems社製）を用いて行なった。0.5ml容のマイクロチューブに9.5μlの反応ストック液、4.0μlの0.8pmol/μlの-21M13ユニバーサルプライマー（Applied Biosystems社製）および6.5μlの0.16μg/μlのシーケンス用鋳型DNAを加えて混合し、100μlのミネラルオイルを重層後、96℃30秒、55℃15秒および60℃4分を1サイクルとするPCR増幅反応を25サイクル行ない、4℃で5分間保温した。反応後、80μlの滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を3回のフェノール・クロロホルム抽出を行なった。100μlの水層に10μlの3M酢酸ナトリウム（pH5.2）および300μlのエタノールを加えて攪拌後、室温、14,000rpmにて15分間の遠心を行ない沈殿を回収した。沈殿を75%エタノールで洗浄後、真空下に2分間静置して乾燥させ、シーケンササンプルとした。シーケンササンプルは、4μlの1

0mMのEDTAを含むホルムアミドに溶解して90℃、2分間で変性後、水中で冷却してシーケンサに供した。

【0063】75のクローンについてDNA配列決定を行ったところ、3個のクローンがそれぞれ配列表配列番号6、7、8のDNA配列に対応する配列を有していた（両端のプライマーの配列を含む）。GenBankのデータベース（リリース103.0, October, 1997年）のサーチの結果、この配列は7回膜貫通型受容体群と類似していることが判明した（以下、この断片をET331, ET330, ET64断片とよぶ）。さらにこれらをお互いに比較したところ、お互いに80%以上類似しており、遺伝子ファミリーを構成することが明らかになった（以下これらの遺伝子から構成される遺伝子ファミリーをERG（ET331-related genes）と呼ぶ。

【0064】

【実施例4】新規7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5全長遺伝子の取得

マウス肺由来のcDNAライブラリー（CLONTECH社、Cat#ML1046b）からブランクハイブリダイゼーションにてET331断片とハイブリダイズするクローンの検索を行った。10⁶個相当のブランクをMolecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Pressの2.109-111, Immobilization of bacteriophage λ plaques on nitrocellulose filtersに従ってプレートし、出現したブランクをナイロンフィルター（Hybond N+; Amersham社製）に転写し、転写したナイロンフィルターをアルカリ処理（1.5M NaCl, 0.5M NaOHを染み込ませた濾紙上に5分間放置）し、次いで中和処理（1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl（pH7.5）を染み込ませた濾紙上に5分間放置）を2回行い、次に2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液は0.15M NaCl, 15mMクエン酸pH7.0; 以下SSCと略す）中で5分間、2度振とう洗浄し風乾した。その後、UVクロスリンカー（フナコシ社製、モデルCL-1000）を用いて、このフィルターの紫外線照射を1200×160マイクロジュール/cm²で行った。このフィルターを用いて放射性同位元素³²Pにて標識されたET331遺伝子断片をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。

【0065】放射性同位元素³²Pにて標識されたET331断片プローブは以下のように作製した。すなわち、ET331断片が組み込まれたベクターpCRIIよ

り、制限酵素EcoRIにてベクターより切り出し、0.8%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約700bpのバンドをゲルから切り出してGENECLEAN II Kit（フナコシ社製）を用いて精製した。得られたDNA断片をDNAラベリングキット（Megaprime DNA labeling system: Amersham社製コードRPN1607）を用いて標識した。すなわち、DNA100ngにプライマー液10 μ l、5 \times 反応緩衝溶液20 μ l及び脱イオン水を加えて全量を86 μ lとして沸騰水浴を5分間行い、その後、 α -³²P-dCTP（アマーシャム社製、コードAA 0005）10 μ l、及びKlenow酵素溶液4 μ lを加えて、37 $^{\circ}$ Cで10分間水浴し、放射標識したET331断片を合成した。更にその後、セファデックスカラム（Quick Spin Column Sephadex G-50: 独逸国ベリンガー・マンハイム社製）で精製し、5分間沸騰水浴をしたのち、2分間氷冷後使用した。

【0066】前述の方法にて作成したフィルターを、各々の成分の最終濃度が6倍濃度のSSC溶液、5倍濃度のデンハルト液（和光純薬社製）、0.5% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬社製）、及び100 μ g/mlの沸騰水浴により変性したサケ精子DNA（Sigma社製）を含むハイブリダイゼーション液中に浸し、65 $^{\circ}$ Cにて2時間振とうしたのち、前述の方法で³²P標識されたプローブをハイブリダイゼーション液に添加し、65 $^{\circ}$ Cにて16時間振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。

【0067】次に、フィルターを0.1% SDSを含む、各々の成分の最終濃度が2倍濃度のSSC溶液に浸し、室温で3回洗浄後、さらに同溶液で室温で15分間洗浄した。洗浄を終了したフィルターを増感スクリーンを使用して、-85 $^{\circ}$ Cでオートラジオグラフィーを行った。その結果、強く露光された部分のクローンを拾い、再度プラークを蒔き直し前述の方法にてスクリーニングを行い、完全に単独のクローンを分離した。

【0068】単離されたファージクローンのうち6クローンを以降の遺伝子配列決定に供した。Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Pressの2.70, の方法に従い、これらのすべてのクローンのファージを約10⁹ pfu (plaque forming unit) 調製し、Wizard lambda preps (Promega) を用いてファージDNAを精製し、制限酵素EcoRIにて消化し、同様に制限酵素EcoRIで消化したプラスミドpBluescri

ptIIKS (+) (Stratagene社製) に組み込んだ。これらのクローンのDNA配列をDNAシーケンサーにより解析し、配列表配列番号2にあるDNA配列を決定した。配列表配列番号2のDNA配列の1番目の塩基Aから963番目の塩基Cまでの塩基配列がERG5の構造遺伝子（タンパク質をコードしているDNA配列）である。

【0069】

【実施例5】7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5発現ベクターの作製

実施例4で単離されたERG5全長遺伝子を含むプラスミドクローンを鋳型としてERG5遺伝子のPCR (polymerase chain reaction) を行った。PCRにはHigh Fidelity Taqポリメラーゼ（ベリンガー・マンハイム社製）を用いた。このプラスミド溶液1 μ l (DNA5ngを含む) に脱イオン水37.5 μ l、Taqポリメラーゼ0.5 μ lと、Taqポリメラーゼに添付のバッファー5 μ lと、2.5mM dNTP mixture (宝酒造社製) 4 μ lと、配列表配列番号9に示したオリゴヌクレオチド（配列表配列番号2のDNA配列の1番目のAから20番目のGの20塩基配列の5'末端に塩基Gおよび制限酵素EcoRIの酵素配列GAATTCとスパーサー配列CACCTとを加えたもの）、および配列表配列番号10に示したオリゴヌクレオチド（配列表配列番号2のDNA配列の942番目のCから966番目のAの25塩基配列の相補的配列の5'末端に塩基Gおよび制限酵素EcoRIの認識配列GAATTCを加えたもの）を、それぞれ20ピコモルを加え、最終容量50 μ lとした。

【0070】この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、94 $^{\circ}$ C 3分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 2分を1サイクル行ったのち、94 $^{\circ}$ C 30秒、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 2分を2サイクル行い、94 $^{\circ}$ C 30秒、65 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 2分を21サイクル行って、最後に94 $^{\circ}$ C 30秒、65 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 7分の反応を行った。このPCR産物の一部を0.8%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約980bpのcDNAが増幅されていることを確認した。

【0071】残りのPCR反応溶液を0.8%アガロースゲル上で分離し、目的とする遺伝子産物をゲルから切り出し、GENECLEAN IIを用いて、DNAの精製を行った。この精製DNAをpTarget (TM) Mammalian Expression Vector System (Promega社製) を用い、添付のプロトコールに従って、pTarget (TM) ベクターに組み込んだ。DNAが組み込まれたpTarget (TM) を大腸菌INV α ' Com

petent Cells (Invitrogen社製) に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma社製) を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む L-Broth (宝酒造社製) 半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度 37°C に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2 ml に植え付け、18時間程度 37°C で振とう培養し、菌体を回収し、ウイザードミニブレップ (Promega社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離した。このプラスミドを制限酵素 EcoRI にて消化して、約 1 kbp の DNA が切り出されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行い、ERG5 の発現ベクター、pERG5 を得た。

【0072】尚、このプラスミド pERG5 を大腸菌 INV α F' に遺伝子導入した形質転換細胞 E. coli: INV α F' - pERG5 は、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年3月19日に受託番号: FERM BP-6302 として寄託されている。

【0073】

【実施例6】発現ベクターの細胞への遺伝子導入と発現
実施例5で作製した発現ベクターを293細胞 (ATCC: CRL-1573) に遺伝子導入した。遺伝子導入前の細胞の継代は、Dulobecco's modified MEM (D-MEM 液体培地) を用い、10% ウシ血清 (56°C 20分間熱処理して非働化した)、100分の1量の Penicillin-Streptomycin 溶液 (大日本製薬 (株) Cat. No. 16-70D-49DN) を加えた。細胞は、 5×10^4 個/ ml から 5×10^5 個/ ml の濃度で培地中に植え付け、 37°C 、5% 二酸化炭素、湿度100%で培養し、コンフルエントになるまで培養した。培地を吸引・廃棄し、EDTA トリアシン液 (Cosmo Bio Co., Ltd.) 処理により、細胞をプレート底面よりはがした。前記の培地 (血清を含む) を加えて反応を停止させた。その後、ピペッティングによって細胞を均一に懸濁し、遠心して (1000 rpm 15分; KS-8300型、久保田製作所、RS3000/6型ローター) 回収し、新しい培地に再度懸濁し継代した。遺伝子導入は、Invitrogen社のキット (Cat. No. IV2780-1) を用いリン酸カルシウム共沈法にて行い (添付のプロトコル6ページ)、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5をコードするDNAを保持する形質転換体を作成した。DNAは 100 m ディッシュあたり $5 \mu\text{g}$ を用いた。

【0074】膜画分の調製は、以下のように行った。pERG5を遺伝子導入した細胞およびpcDNA3プラスミドを導入した細胞を24~48時間培養した。その後、培地はアスピレータで吸引し廃棄し、PBS (大日本製薬 (株) Cat. No. 28-103-05) を用

いて細胞を洗浄し、その後 $1 \text{ ml}/\text{ディッシュ}$ の 1.5 mM EDTA/PBS を加え、ディッシュからはがした。その後、PBSで2度洗浄し、 1 ml の hypotonic buffer (25 mM Hepes, pH 7.4) に懸濁した。この細胞懸濁液を Polytro n (KINEMATIKA社製、PT10-SK) で破碎し、マイクロチューブ用遠心機 (トミー精工、MRX-150型) で 4°C 、 $13000 \times g$ で15分間遠心した。上清を捨て、さらに2度hypotonic bufferを加え懸濁後、同じ条件で遠心し、沈殿物を膜画分とした。

【0075】こうして得られた膜画分を用いてウェスタンブロッティング法にて7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5の発現を確認した。すなわち、膜画分をACIジャパン社製のSDS-PAGE用電気泳動槽及びSDS-PAGE用ポリアクリルアミドゲル (グラジエントゲル5~15%) を用い、添付の取扱説明書に従ってSDS-PAGEをおこなった。サンプルは2-メルカプトエタノール (2-ME) を加えて5分間の沸騰水浴加熱処理により還元処理を行った。マーカーとしてはAmersham社製レーンボーマーカー (高分子量用) を用い、サンプルバッファー、泳動バッファーについては添付の取扱説明書に従って作製した。SDS-PAGE終了後、アクリルアミドゲルをPVDFメンブランフィルター (BioRad社製) に同社製ミントランスブロットセルにより転写した。

【0076】このように作製されたフィルターを5%スキムミルク、TBS-T (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl (pH 7.6)、0.1% Tween 20) で一時間振とうしてブロッキングした。ECLウェスタンブロッティング検出システム (Amersham社) に添付の説明書に従い、一次抗体として実施例10に記載した抗ERG5抗血清を用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGロバ抗体 (Amersham社製) を反応させた。

【0077】抗体の反応時間は各々室温で一時間反応させ、各反応間はTBS-Tにて10分間室温で振とう洗浄する操作を3回ずつ繰り返した。最後の洗浄後、フィルターをECLウェスタンブロッティング検出システム (Amersham社製) の反応液に5分間浸し、ポリ塩化ビニリデンラップに包んでX線フィルムに感光させた。分子量マーカーとの比較の結果、約 45 kD のバンドが遺伝子導入をしたものについてのみ得られ、遺伝子導入をしていない細胞には観察されなかった。

【0078】

【実施例7】リガンドのスクリーニング

遺伝子導入を行わない293細胞とERG5形質転換体293細胞の膜画分を実施例6と同様にして調製した。膜画分調製液 $50 \mu\text{l}$ もしくはPBS (大日本製薬 (株) Cat. No. 28-103-05) と放射性標

識された候補化合物CGS 21680 (Dupont NEN社、カタログ番号 NET-1021) 50 μ l (終濃度100 nM)、PBS 50 μ lを加え、全量を150 μ lとした。混合して候補化合物と7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5を接触させ、37°Cで30分間保温した後、マイクロチューブ用遠心機(トミー精工、MRX-150型)で室温、15000xgで15分間遠心し、ERG5蛋白質と結合した候補化合物と結合していないものを分離した。その上清を1 μ lとり、10mlの液体シンチレーター用カクテル(Dupont NEN, ECONOFLUOR-2)に加え、混合した。その後、Beckman LS6000LL型シンチレーションカウンターを使用して放射活性をカウントし、ERG5遺伝子導入の有無で得られた放射活性を比較した。その結果、得られた放射活性はERG5遺伝子導入の有無で差がなかった。

【0079】

【実施例8】リガンドのスクリーニング

実施例6で作製したERG5発現293細胞を用いた。ここではpERG5遺伝子導入2日後、種々の細胞濃度で400 μ g/mlの濃度のネオマイシン(Geneticin, GIBCO BRL 1811-023)を含む培地に植え替えた。その後、2週間前後培養し増殖した細胞をERG5発現細胞とした。以上のように作成した7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5発現細胞を用いて、細胞増殖の測定を行った。リガンド候補物質としては、LPS(リボポリサッカライド)投与ラット血清を用いた。7週令のWistarラットを(株)日本生物材料より購入した。サルモネラミネソタRE595由来LPS(Sigma社製)を日本薬局方生理食塩水に最終濃度1mg/mlになるように懸濁した。懸濁液をソニケーター(Branson)でソニケートし、透明な液とした。これを日本薬局方生理食塩水で10倍に希釈し、400 μ l、尾静脈より投与した。投与後約22時間後のラットをエーテル麻酔し開腹して心臓より採血した。マイクロチューブ用遠心機(トミー精工、MRX-150型)で4°C、13000xgで15分間遠心し、その上清を-20°Cで保存した。これを被検物質溶液とした。

【0080】96穴マイクロプレート(コーニング:カタログ番号430247)にERG5発現293細胞を5x10³細胞/穴で播種した。これにD-MEMで被検物質溶液を10倍希釈して加え、終容量を200 μ l/穴とした。この状態で細胞を5%二酸化炭素、37°Cで3日間培養した後、細胞増殖をMTT kit(ケミコン社:CT-02)により測定した。その結果、LPS投与ラット血清の濃度に依存した細胞増殖が観察された。

【0081】

【実施例9】リガンドと拮抗する物質のスクリーニング
ERG5形質転換293細胞を用い形質転換体の細胞増

殖試験を行った。(i)実施例8で作製したERG5形質転換293細胞に発現する7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5と実施例8に示したLPS投与ラット血清をリガンドとして用いて実施例8と同様に細胞増殖を測定した。さらに、(ii)実施例8の実験の際に培養液中に最終濃度100 μ MのNECA(N-エチルカルボキシアミドアデノシン、Sigma社製)を加えて実施例8と同様に培養を行い細胞増殖を測定した。(i)、(ii)を比較したが、両者に差はなかった。

【0082】

【実施例10】ERG5蛋白質を認識する抗体の作成
配列表配列番号1の292番目から321番目のペプチドを合成した。その際、キャリアー蛋白質との結合反応のためにN末端にシステイン残基を導入した。そしてImject Activated Immunogen Conjugation Kit with KLH and OVA(PIERCE社:77107)を用いてKLH(Keyhole limpet hemocyanin)、OVA(Ovalbumin)と合成ペプチドをコンジュゲートし、免疫原とした(製造者のプロトコル、p.3)。これをウサギに免疫し、抗体価の測定後全血の採血を行い、血清を採取した。これをBioRad社製のエコノバック血清IgG精製キットを用いて、添付の取扱説明書に従って、抗マウスERG5蛋白質ウサギポリクローナル抗体を精製して作製した。

【0083】

【実施例11】ヒトにおけるERGファミリーの検出
実施例3でえられたET331、ET330、ET64の配列を用いてnr-ntデータベース(Genome Net、1998年6月11日)をBLASTNプログラムを用いてサーチした。Pが10⁻⁶以下を有意な類似と見なしたところ、ET331(配列表配列番号6)から既知の遺伝子の他に、ヒトEST(Expressed Sequence Tag)断片、エントリーAF003828およびヒトゲノム遺伝子断片エントリーB74348が有意に類似していた。同様にET330(配列表配列番号7)とヒトゲノム遺伝子断片エントリーB74348が、また、ET64(配列表配列番号8)とヒトEST(Expressed Sequence Tag)断片、エントリーAF003828が類似していた。従って、ヒトゲノム遺伝子断片エントリーB74348よりヒトゲノム遺伝子中にERGファミリーに属する7回膜貫通型受容体の配列が少なくとも一つ存在することが示された。また、ヒトEST(Expressed Sequence Tag)断片、エントリーAF003828により少なくとも一つのERGファミリーに属する7回膜貫通型受容体がヒト細胞に発現していることが示された。

【0084】

【発明の効果】本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5は、白血球やガン細胞を含む種々の細胞の増殖や機能を制御する医薬品を検索することに使用が可能であ

る。

【0085】

【配列表】

<110>: Asahi Chemical Industry Co., Ltd.
 <120>: 7回膜貫通型受容体蛋白質ERG5
 <130>: X10-00791
 <160>: 10
 <210>: 1
 <211>: 321
 <212>: PRT
 <213>: Mus Musculus
 <400>: 1

Met Asn Ser Thr Leu Asp Ser Ser Pro Ala Pro Gly Leu Thr Ile Ser
 1 5 10 15
 Pro Thr Met Asp Leu Val Thr Trp Ile Tyr Phe Ser Val Thr Phe Leu
 20 25 30
 Ala Met Ala Thr Cys Val Gly Gly Met Ala Gly Asn Ser Leu Val Ile
 35 40 45
 Trp Leu Leu Ser Cys Asn Gly Met Gln Arg Ser Pro Phe Cys Val Tyr
 50 55 60
 Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Phe Leu Phe Cys Met Ala
 65 70 75 80
 Ser Met Leu Ser Leu Glu Thr Gly Pro Leu Leu Ile Val Asn Ile Ser
 85 90 95
 Ala Lys Ile Tyr Glu Gly Met Arg Arg Ile Lys Tyr Phe Ala Tyr Thr
 100 105 110
 Ala Gly Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser
 115 120 125
 Val Leu Phe Pro Ile Trp Tyr Lys Cys His Arg Pro Arg His Leu Ser
 130 135 140
 Ser Val Val Ser Gly Ala Leu Trp Ala Leu Ala Phe Leu Met Asn Phe
 145 150 155 160
 Leu Ala Ser Phe Phe Cys Val Gln Phe Trp His Pro Asn Lys His Gln
 165 170 175
 Cys Phe Lys Val Asp Ile Val Phe Asn Ser Leu Ile Leu Gly Ile Phe
 180 185 190
 Met Pro Val Met Ile Leu Thr Ser Thr Ile Leu Phe Ile Arg Val Arg
 195 200 205
 Lys Asn Ser Leu Met Gln Arg Arg Arg Pro Arg Arg Leu Tyr Val Val
 210 215 220
 Ile Leu Thr Ser Ile Leu Val Phe Leu Thr Cys Ser Leu Pro Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Trp Phe Leu Leu Tyr Trp Val Asp Val Lys Arg Asp Val Arg
 245 250 255
 Leu Leu Tyr Ser Cys Val Ser Arg Phe Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser
 260 265 270
 Ala Asn Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Gln Lys Ser His Arg
 275 280 285
 Leu Gln Glu Ser Leu Gly Ala Val Leu Gly Arg Ala Leu Arg Asp Glu
 290 295 300
 Pro Glu Pro Glu Gly Arg Glu Thr Pro Ser Thr Cys Thr Asn Asp Gly

[0086]

```

305                               310                               315                               320
Val

<;210>; 2
<;211>; 966
<;212>; DNA
<;213>; Mus Musculus
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (1)...(963)
<;400>; 2

atg aac tcc act ctt gac agc agc cca gct cca ggt ctg acc atc agt      48
Met Asn Ser Thr Leu Asp Ser Ser Pro Ala Pro Gly Leu Thr Ile Ser
      1              5              10              15
ccc acc atg gac ctt gtg acc tgg atc tac ttt tca gtg aca ttc ctc      96
Pro Thr Met Asp Leu Val Thr Trp Ile Tyr Phe Ser Val Thr Phe Leu
      20              25              30
gcc atg gcc acg tgt gtg ggg ggg atg gca ggc aac tca ttg gtg att      144
Ala Met Ala Thr Cys Val Gly Gly Met Ala Gly Asn Ser Leu Val Ile
      35              40              45
tgg ctc ctg agc tgc aac ggc atg cag agg tct ccc ttc tgt gtc tat      192
Trp Leu Leu Ser Cys Asn Gly Met Gln Arg Ser Pro Phe Cys Val Tyr
      50              55              60
gtg ctc aac ctg gcg gtg gct gac ttc ctc ttc tta ttc tgc atg gcc      240
Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Phe Leu Phe Cys Met Ala
      65              70              75              80
tcc atg ctc agc ctg gaa aca ggg ccc ctg ctc ata gtc aac att tct      288
Ser Met Leu Ser Leu Glu Thr Gly Pro Leu Leu Ile Val Asn Ile Ser
      85              90              95
gcc aaa atc tat gaa ggg atg agg aga atc aag tac ttt gcc tat aca      336
Ala Lys Ile Tyr Glu Gly Met Arg Arg Ile Lys Tyr Phe Ala Tyr Thr
      100             105             110
gca ggc ctg agc ctg ctg aca gcc atc agc acc cag cgc tgc ctc tcc      384
Ala Gly Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser
      115             120             125
gtg ctt ttc ccc atc tgg tat aag tgc cac cgg ccc cgg cac ctg tca      432
Val Leu Phe Pro Ile Trp Tyr Lys Cys His Arg Pro Arg His Leu Ser
      130             135             140
tca gtg gta tct ggt gca ctc tgg gca ctg gcc ttc ctg atg aac ttc      480
Ser Val Val Ser Gly Ala Leu Trp Ala Leu Ala Phe Leu Met Asn Phe
      145             150             155             160
ctg gct tct ttc ttc tgc gtc caa ttc tgg cat ccc aac aaa cac cag      528
Leu Ala Ser Phe Phe Cys Val Gln Phe Trp His Pro Asn Lys His Gln
      165             170             175
tgc ttc aag gtg gac att gtt ttc aac agt ctt atc ctg ggg atc ttc      576
Cys Phe Lys Val Asp Ile Val Phe Asn Ser Leu Ile Leu Gly Ile Phe
      180             185             190
atg ccg gtc atg atc ctg acc agc acc atc ctc ttc atc cgg gtg cgg      624
Met Pro Val Met Ile Leu Thr Ser Thr Ile Leu Phe Ile Arg Val Arg
      195             200             205

```

```

aag aac agc ctg atg cag aga cgg cgg ccc cgg cgg ctg tac gtg gtc 672
Lys Asn Ser Leu Met Gln Arg Arg Arg Pro Arg Arg Leu Tyr Val Val
    210          215          220
atc ctg act tcc atc cta gtc ttc ctc acc tgt tct ctg ccc ttg ggc 720
Ile Leu Thr Ser Ile Leu Val Phe Leu Thr Cys Ser Leu Pro Leu Gly
225          230          235          240
atc aac tgg ttc tta ctc tac tgg gtg gat gtg aaa cgg gat gtg agg 768
Ile Asn Trp Phe Leu Leu Tyr Trp Val Asp Val Lys Arg Asp Val Arg
    245          250          255
cta ctt tat agc tgc gta tca cgc ttc tct tca tct ttg agc agc agt 816
Leu Leu Tyr Ser Cys Val Ser Arg Phe Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser
    260          265          270
gcc aac cgg gtc att tac ttc ctc gtg ggc agc cag aag agc cac cgg 864
Ala Asn Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Gln Lys Ser His Arg
    275          280          285
ctg cag gag tcc ctg ggt gct gtg ctg ggg cgg gca ctg cgg gat gag 912
Leu Gln Glu Ser Leu Gly Ala Val Leu Gly Arg Ala Leu Arg Asp Glu
    290          295          300
cct gag cca gag ggc aga gag acg cca tcc acg tgt act aat gat ggg 960
Pro Glu Pro Glu Gly Arg Glu Thr Pro Ser Thr Cys Thr Asn Asp Gly
305          310          315          320
gtc tga 966
Val

```

【0087】

```

<;210>; 3
<;211>; 13
<;212>; PRT
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; マウスにおいてEAE（実験的アレルギー性脳脊髄炎）の発症を誘導する
モルモット由来 myelin basic protein の部分ペプチド。
<;400>; 3

```

```

Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser
    1          5          10

```

```

<;210>; 4
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; 18、22、24残基めのnはイノシン/iを示す。
メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の7回膜貫通型受容体蛋白
質の配列をもとにデザインしたdegenerativePCR法のためのプライマー。
<;400>; 4
atcttaagct tgaacctn gc cntngcdgac 30

```

【0088】

```

<;210>; 5
<;211>; 33
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

```

<;220>;

<;223>; 22、28残基めのnはイノシン/iを示す。

21残基めのnはAまたはGまたはCまたはTを示す。

メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の7回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインしたdegenerativePCR法のためのプライマー。

<;400>; 5

cccaacgaat tcrtagatsa nnggrttnav rca 33

<;210>; 6

<;211>; 654

<;212>; DNA

<;213>; Mus Musculus

<;400>; 6

```

atcttaagct tgaacctggc cgtggcagac ttcttctatc tgctctgtca catcataaat 60
tcacataatgt ttcttctcaa ggttccctca cccaacatta tcttgacca ttgcttttac 120
accatcatga tagttctcta catcacagge ctgagcatgc tcagcgccat cagcactgag 180
cgctgcctgt ctgtctctgt ccccatctgg tatcgctgcc accgtccaga acacacatca 240
actgtcatgt gtgctgtgat ctgggtaatg tccctgttga tctctattct caatggatat 300
ttctgtaatt tctctagtcc caaatatgta aataactctg tgtgtcagge atcagacatc 360
tttatcagaa catacccaat atttttgttt gtactcctct gtctgtccac ccttgctctg 420
ctggccaggt tgttctctgg tctgggaag aggaaattta ccagattatt cgtgaccatc 480
atgctggcca ttttggtttt tcttctctgt gggttacccc tgggcttctt ctggtttctg 540
tcacctgga ttgaggatcg ttccattgta ctagattata gactttttt tgcacagtt 600
gtcctaactg ttgttaacag ctgcgtcaac cccatcatct acgaattcgt tggg 654

```

【0089】

<;210>; 7

<;211>; 654

<;212>; DNA

<;213>; Mus Musculus

<;400>; 7

```

atcttaagct tgaacctggc cgtggctgac ttctcttcc ttctctgtca catcatcagt 60
tcacacatgc ttcttctcaa ggttctccga cccaactgga tcttgccct ttgctttaac 120
accatcagaa cggttctcta catcacagge ctgagcatgc tcagcgccat cagcactgag 180
cgctgcctgt ctgtctctgt ccccatctgg taatgatgcc gtcgccgaga aaacacatca 240
gctgccatgt gtgctgtgat ctgggtctct tccctgttga tctgcatctt gaatagatat 300
ttctgttatt tctctggtcc caaatatgta aatgactctg tgtgtctggt atctatattc 360
ttcattagaa catacccaat gtttttgttt gtcacccctt gtctgtccac actgactctg 420
atggccaggt tgttctgtgg tctgggaag aggaaattta cccgattatt cgtgaccatc 480
atactgaccg ttttggtttt tcttctgtgt ggttgcccc tggcattcta ctggttctg 540
ttatactgga ttaaaggttag ttccagtga ctacgtaata gactttttca ggcacactt 600
gtcctaactg ctattaacag ctgcgtcaac cccatgatct acgaattcgt tggg 654

```

<;210>; 8

<;211>; 654

<;212>; DNA

<;213>; Mus Musculus

【0090】

<;400>; 8

```

atcttaagct tgaacctggc cgtggctgac ttctcttcc ttctctgcca catcataaat 60
tcacacgtac ttcttctcaa ggttccctca cccaactgga tcttggtcca ttgctttaac 120

```

accatcagaa ttgttcttta catcacaggc ctgaacatgc tcagtgccat caacatggag 180
 cactgectgt ctgtcctgtg ccccatctgg tatcactgct gccgccaga acacacatca 240
 actgtcatgt gtgtctgat ctgggtctg tccctgtga tctgcattct gaatgaatat 300
 ttctgtgatt tctttgttac caaattgga aattactatg tgtgtctggc atcgaacttc 360
 tttatgggag catacctgtt gtttctgttt gtagtcctct gtctgtccac cctggctctg 420
 ctggccaggt tgttctgtgg tctgtggaat acgaaattta ccagatttca catgaccatc 480
 ttgtgaccc ctttgttctt tctcctctgc gggttgccct ttgccatcta atgcttctg 540
 ttattcaaga ttaaggatga tttccatgta ttttatatta acctttttct agcattagaa 600
 gtctgactt ctattaacag ctgtctcaac cccgtgatct acgaattcgt tggg 654

<;210>; 9

<;211>; 31

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; E R G 5の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマー。配列表配列番号2のDNA配列の1番目のAから20番目のGの20塩基配列の5'末端に塩基Gおよび制限酵素E c o R Iの酵素配列G A A T T Cとスパーサー配列C A C Cとを加えたもの。

【0091】

<;400>; 9

ggaattccac catgaactcc actcttgaca g 31

<;210>; 10

<;211>; 32

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; E R G 5の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマー。配列表配列番号2のDNA配列の942番目のCから966番目のAの25塩基配列の相補的配列の5'末端に塩基Gおよび制限酵素E c o R Iの認識配列G A A T T Cを加えたもの。

<;400>; 10

ggaattctca gaccccatca ttagtacag tg 32

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-コード(参考)
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/53	D
	33/53	33/566	
	33/566	33/577	B
	33/577	C 1 2 N 5/00	B
//(C 1 2 N 5/10			
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 AA13 AA14
BA80 DA02 EA03 EA04 GA11
HA11 HA17
4B064 AG01 CA10 DA05 DA13 DA14
DA15
4B065 AA91X AB01 BA02 CA24
CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 CA40
DA50 DA75 DA76 DA86 EA28
EA50 FA71 FA72 FA73 FA74

